

FREQUÊNCIA RELATIVA DE FIMBRIAS DAS AMOSTRAS DE *Escherichia coli* COLETADAS DE BEZERROS COM DIARREIA NO RECÔNCAVO DA BAHIA

Bruna de Jesus Mamona¹; Claudio Roberto Nóbrega Amorim²

1. Voluntária de Iniciação Científica, Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: bjmamona@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológica, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: amorim@uefs.com

PALAVRAS-CHAVE: *Escherichia*; Fímbria; Colibacilose.

INTRODUÇÃO

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae, que coloniza o trato intestinal de vertebrados e apresenta como características formato de bastonete, respiração anaeróbia facultativa e tem como temperatura ideal para seu crescimento 37°C (Almeida, 2013; Pereira, 2016). Em grande parte, cepas de *E. coli* estabelecem relação de comensalismo com seu hospedeiro, porém existem cepas patogênicas que causam infecções extraintestinais e infecções intestinais como diarreia e desintéria (Almeida, 2013; Kaper *et al.*, 2004; Nataro & Kaper, 1998; Pereira *et al.*, 2016). A *E. coli* pode ser classificada de acordo com os fatores de virulência que apresenta, como por exemplo fímbrias e produção de toxinas, estando estes relacionados a patogenicidade (Almeida, 2013). A *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) está frequentemente associada com a promoção de quadro diarreico em bezerros neonatos, chamado de colibacilose, devido a colonização do trato intestinal a partir de fímbrias e toxinas (Reck, 2009).

As fímbrias são moléculas proteicas localizadas na superfície celular da bactéria que promove a aderência às células epiteliais do hospedeiro (Almeida, 2013). Podem ser classificadas quanto à sua capacidade de aglutinação com hemácias em presença do carboidrato D-manose, quando ocorre a hemaglutinação são chamadas manose resistentes (MR) e quando a hemaglutinação é inibida são chamadas de manose sensíveis (MS) (Almeida, 2013). Os tipos fimbriais comumente relacionados a cepa de ETEC colonizadoras de trato intestinal de bezerros, são: F5 (K99), F17 e F41 (Salvatori *et al.*, 2013). Dessa maneira, o trabalho teve como objetivo identificar os tipos de fímbrias em *E. coli* isolada das amostras de fezes coletadas de bezerros com diarreia no recôncavo baiano e a partir disso, realizar uma análise de frequência relativa.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA

As análises foram feitas a partir de 25 amostras de fezes de bezerros recém-nascidos apresentando diarreia, que foram gentilmente cedidas pelo Professor Joselito Nunes Costa, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Recôncavo Baiano, no laboratório de Microbiologia Aplicada a Saúde (LAMASP) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Para o isolamento de *Escherichia coli*, as amostras foram diluídas em meio tamponado pH 7,4, esterilizado, e semeadas em meio de cultura Agar MacConkey por 24h a 37°C. As colônias indicativas de

fermentadoras de lactose, foram inoculadas em caldo BHI por 24h a 37°C e posteriormente inoculada em caldo EC com tudo de Durham invertido, por 24h a 45°C em banho-maria. As amostras que apresentaram turbidez no caldo e produção de gás no tubo de Durham, foram semeadas no Agar Eosina-Azul de Metileno (EMB) com incubação de 24h a 48h em temperatura de 35°C. Após esse período, as colônias que apresentaram crescimento com coloração verde metálica, seguiram para identificação bioquímica.

As provas bioquímicas consistiram em: produção de indol, prova do vermelho de metila (VM), prova de Voges-Proskauer (VP), utilização do citrato, descarboxilação da lisina, produção de sulfeto de hidrogênio e prova da motilidade (Koneman, 2001).

Para a identificação genética das fímbrias, inicialmente foram realizados dois métodos de extração de DNA das amostras estudadas e das amostras padrão para as fímbrias F17, F5 e F41 (controle positivo), proposto por Blanco *et al.* (1993) e pelo Canadian Center for Barcoding, ambos com modificações.

As tentativas para detecção e identificação das fímbrias foram feitas por meio de PCR utilizando-se primers específicos para cada tipo fimbrial e por fim, a aplicação do produto da PCR foi feita em gel de agarose 2% (eletroforese) com tampão TBE (1X) a 100V por 40 minutos, utilizando o GelRed, corante para ácidos nucleicos, para leitura. As diversas formas de tentativas de adequação da bioquímica da PCR para a obtenção de resultados confiáveis, consistiram em: concentração do DNA extraído - sem diluição e diluído a 200ng/μl, 100ng/μl, 50ng/μl e 1:10; alteração da Taq DNA polimerase - Taq DNA polimerase comum ou Top-Taq DNA polimerase; quantidade de primer utilizado - 2μl ou 1μl; quantidade de Taq DNA polimerase (2,5U) utilizada - 0,5μl ou 0,3μl; alteração dos reagentes utilizados - dnTP, solução trabalho do primer e H₂O; PCR realizada com gradiente de temperatura; quantidade DNA utilizado - 1μl e 0,5μl; extração de DNA refeita.

Essas modificações foram realizadas em cima do protocolo proposto por Clermont *et al.* (2000), onde as quantidades de reagentes para a PCR são indicadas, para uma solução total de 20μl, como sendo: 2μl de buffer (10x), 0,8μl de MgCl₂ (50mM), 2μl de primer 1 (20pMol), 2μl de primer 2 (20 pMol), 0,5μl de Taq DNA polimerase (2,5U), 1μl de dNTP, 1μl de DNA (200ng/μl) e água q.s.p (para completar o volume final). No entanto, a solução final foi ajustada para 25μl adicionando-se somente mais água. O programa para o termociclador consistiu em um estágio inicial de 5 minutos a 94°C; 30 ciclos de desnaturação a 94° por 30 segundos, mais anelamento por 30 segundos com a temperatura ideal para cada primer (56°C para F41, 60°C para F5 e 65° para F17) e extensão a 72°C por 30 segundos; e finalizando com uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

RESULTADOS ALCANÇADOS E DISCUSSÃO

A semeadura das amostras no Agar MacConkey mostrou crescimento de colônias fermentadoras de lactose, característica conferida a *Escherichia coli* e, portanto, indicando a possibilidade de as amostras serem de *E. coli*. As colônias fermentadoras de lactose que foram inoculadas no caldo EC apresentaram crescimento e produção de gás no tubo de durhan, sendo mais um indicativo de *E. coli*. As colônias crescidas no caldo EC apresentaram crescimento de colônias verdes metálicas ao serem semeadas no Agar Eosina-Azul e Metileno (EMB), resultado que indica que se tratava de uma bactéria gram-negativa. Os resultados dos testes bioquímicos corroboraram que as amostras de fato eram de *Escherichia coli*, apresentando resultados positivos para os testes VM (vermelho de metila), produção de indol e descarboxilação da lisina e resultados negativos para os testes VP (Voges-Proskauer), produção de sulfeto de hidrogênio,

utilização do citrato e motilidade. Segundo Fortes (2010) o teste de motilidade pode apresentar tanto resultado negativo quanto positivo, pois a locomoção é uma característica variável nas cepas de *E. coli*, no entanto, todas as amostras testadas não apresentaram locomoção, indicando a falta de flagelos locomotores.

A primeira PCR realizada para a detecção da fímbria F41 com 20 amostras escolhidas aleatoriamente mais a amostra padrão, utilizando-se 1 µl de DNA (100ng/µl) indicou bandas de tamanho em torno de 100pb (tendo o ladder como referência) em todos os poços, inclusive no controle negativo. Como as bandas que apareceram possuíam em torno de 100pb, era um indicativo de que o gene não foi amplificado visto que o produto esperado para F41 tem em torno de 431pb e o fato de aparecer banda no controle negativo, poderia indicar uma possível contaminação das amostras durante a realização da solução dos reagentes para a PCR, algo relativamente difícil tendo em vista que para isso a contaminação teria que ser por *Escherichia coli* com região genômica específica para o primer utilizado para uma fímbria que aparece comumente em bezerros. Uma outra possibilidade, seria amplificação do próprio primer ou a falta de anelamento que, como consequência concentrou todo o primer no final da corrida.

A PCR realizada para a fímbria F5 com oito amostras mais a amostra padrão, com a utilização de 1 µl de DNA (100ng/µl), resultou no mesmo que a PCR anterior para a fímbria F41. No entanto, apareceram duas bandas próximas em algumas amostras, um indicativo de dímero de primer, que pode ocorrer quando uma molécula de primer anela com a outra.

Uma nova PCR para eliminação da hipótese de contaminação durante o preparo do mix de PCR foi realizada com poucas amostras e com primers para F41, tomando medidas como utilização de água nova ultrapura, construção do mix na câmara de exaustão e troca de todas as ponteiros durante a pipetagem das amostras do gel de eletroforese. Os resultados obtidos foram iguais às reações em cadeia da polimerase anteriores, indicando que o problema não estava numa possível contaminação.

Outra PCR foi efetuada para os três genes, F5, F41 e F17, utilizando a amostra padrão mais duas amostras aleatórias e o termociclador com gradiente de temperatura variando as colunas 5°C em 5°C em torno do valor central de 60°C. Foram confeccionados 6 mixes diferentes, variando concentração de DNA e quantidade de primers e taq DNA polimerase utilizadas. Os resultados foram os mesmos das tentativas anteriores indicando que possivelmente o problema estaria nas extrações realizadas. Neste método, quatro variáveis foram alteradas, temperatura, DNA, primer e taq DNA polimerase, o esperado seria que pelo menos em uma das amostras padrões aparecesse a banda de acordo com o produto esperado e em cima desse resultado, analisar a mudança na bioquímica que proporcionou o correto anelamento e trabalhar para aplicar nas outras amostras e a partir disso, identificar as fímbrias. Novas extrações foram realizadas e a extração com método de fervura, apontou que continha boa quantidade de DNA íntegro para a realização da PCR, devido à visualização de bandas com incidência mais forte próximo ao poço do gel, o que indica maior tamanho, e menos arrasto de material em comparação com o outro método, resultado de menor fragmentação de material genético.

A PCR para o gene F5 realizada com os métodos de extração refeitos, utilizando a amostra padrão e duas amostras aleatórias, proporcionou como resultado o surgimento de bandas na amostra padrão. Porém, o esperado seria aparecer apenas uma banda, o surgimento de três bandas revela que há uma inespecificidade do primer em relação à região alvo, este problema pode ser resultante da temperatura utilizada para anelamento e uma correção poderia ser o aumento dessa temperatura.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados que foram possíveis obter, nas amostras coletadas de fezes diarreicas de bezerros neonatos haviam cepas de *Escherichia coli*. Com relação a realização para a identificação das fímbrias, o principal problema resultante da não amplificação, residia em como foi conduzida a de extração de DNA. Diante disso, se faz necessário dar continuidade ao estudo, adequando o processo da PCR, para a identificação dessas cepas a partir de seus fatores de virulência, de modo que se obtenha um maior conhecimento acerca dessas estirpes que causaram a enfermidade nestes animais.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. M. S. 2013. **Características biológicas e antigênicas de *Escherichia coli* com ênfase aos genes de virulência**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás. Goiânia.

BLANCO, J. & BLANCO, M. ***Escherichia coli* enterotoxigênicos, necrotoxigênicos verotoxigênicos de origem humano y bovino, patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico**. In Servicio Pub. Diputacion Provincial, Lugo, Espanha. 1993.

FORTES, F. B. B. **Perfil Bioquímico de amostras de *Escherichia coli* isoladas de materiais avícolas no Estado do Rio Grande do Sul e sua relação com a patogenicidade**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P. & MOBLEY, H. L. T. 2004. **Pathogenic *Escherichia coli***. Nature Reviews 2: 123-140.

KONEMAN, E.W. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p.1465.

NATARO, J. P. & KAPER, J. B. 1998. **Diarrheagenic *Escherichia coli***. Clinical Microbiology Reviews 11(1): 142-201.

PEREIRA, D. A. *et al.* 2016. **Virulence factors of *Escherichia coli* in relation to the importance of vaccination in pigs**. Ciência Rural 46(8): 1430-1437.

RECK, M. V. M. 2009. **Diarréia neonatal bovina**. Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária. Porto Alegre.

SALVADORI, M. R. *et al.* 2003. **Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil**. Brazilian Journal of Microbiology 34: 230-235.